



TITLE:

心臓外科領域における
Microfluorometryの応用 2.心筋エネルギー代謝からみた虚血によるミ
トコンドリアの障害と, Cold Blood
Cardioplegia法の安全限界について

AUTHOR(S):

千葉, 幸夫

CITATION:

千葉, 幸夫. 心臓外科領域におけるMicrofluorometryの応用 2.心筋エネルギー代謝からみた虚血によるミトコンドリアの障害と, Cold Blood Cardioplegia法の安全限界について. 日本外科宝函 1982, 51(3): 439-449

ISSUE DATE:

1982-05-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208949>

RIGHT:

心臓外科領域における Microfluorometry の応用
2. 心筋エネルギー代謝からみた虚血による
ミトコンドリアの障害と, Cold Blood Cardioplegia 法
の安全限界について

京都大学医学部外科学教室第2講座(指導: 日笠頼則教授)

千葉 幸 夫

〔原稿受付: 昭和57年2月3日〕

Application of Microfluorometry to Cardiovascular Surgery
II. Evaluation of the Ischemic Mitochondrial Damage and the
Safty Limit of the Intermittent Cold Blood Cardioplegia
by Means of Myocardial Metabolism

YUKIO CHIBA

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

An evaluation of effects of intermittent cold blood cardioplegia on myocardial protection and ischemic mitochondrial damage by means of NADH fluorescence, myocardial PO_2 , high-energy phosphate compounds and mitochondrial respiratory function is described in this report.

In canine placed on cardiopulmonary bypass, the aorta was clamped and a potassium cardioplegic solution was injected into the aortic root. The myocardial temperature was maintained $15^\circ C$ by means of topical cooling. The blood which was collected from the oxygenator, added 20 mEq. per liter of potassium chloride and cooled to $4^\circ C$ was infused into the aortic root from 100 cm height (10 ml/Kg) at 30 minutes intervals.

The NADH fluorescence was monitored from surface of RV and myocardial PO_2 was monitored in LV wall by polarographic measurement. At the end of infusion of cold blood cardioplegic solution (CBC), transmural biopsied of LV were done and the specimens were used for the assay of high-energy phosphate and mitochondrial respiratory function.

Key words: Myocardial protection, Intermittent cold blood cardioplegia, Fluorometry, Myocardial PO_2 , Energy Charge 心筋保護法, 間歇的 K^+ 加冷却血液冠灌流法, 螢光測定法, 心筋組織酸素濃度, エネルギーチャージ
Present Address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan

As soon as the aorta was clamped, the NADH fluorescence was increased and reached a plateau. At the time of infusion of CBC the fluorescence was decreased promptly to the baseline. However, when the ischemic time became more prolonged, ranges of the increase and the decrease of the fluorescence became more diminished gradually. On the other hand, myocardial PO_2 decreased after the aortic clamping and reached a plateau in several minutes. By infusing CBC, myocardial PO_2 increased, and the changes of PO_2 were as described bellow. Between 30 and 150 minutes, the degree of the increase of PO_2 declined gradually, but after 180 minutes the degree became larger contrary to the previous reactions.

The Energy charge and the mitochondrial respiratory function were preserved well until 150 minutes' ischemia but were decreasing after 180 minutes.

This experimental study proves that intermittent cold blood cardioplegia allows the prolonged aortic clamping (3 hours) with greater safety. After 180 minutes' myocardial ischemia the mitochondrial respiratory chain is damaged and the oxygen delivered by CBC is not used any more in mitochondria.

はじめに

Fluorometry 法がリアルタイムに、しかも非破壊的に心筋の Viability を判定できることは第一報で報告

した¹⁾。本論文では、近年開心術において行なわれている心筋保護法のうちで、カリウム加冷却血液による心筋保護法 (Cold Blood Cardioplegia 法) に micro-fluorometry を応用し、螢光量の変化からその有効性

表 1

実験方法 (実験動物 10~16 kg 雌種成犬)

麻 酔	0.4 ml/kg ソムノベンチル 静注後 挿管後 room air にて調節呼吸
開 胸	胸骨横断による両側開胸
体外循環	充填液 乳酸加リンゲル液 500 ml メイロン 40 ml カルチコール 2 A 20%マンニトール 50 ml ヘパリン 5 ml
大動脈遮断	
心停止	(心停止液組成 KC 15 ml 乳酸加リンゲル液 15 ml) 大動脈基部は穿刺した 14G 針より用手法で注入
局所冷却	乳酸加リンゲル液で作成した Ice Slush にて冷却。 心筋温は 15°C 前後とする。
間欠的冠灌流	心人工心肺装置より採取した血液に KCl を加えて、 $K^+25\text{ mEq/l}$ とし 5°C 前後に冷却したものを 毎30分毎約 1 m の高さより点滴注入 (10 ml/kg)
測 定	

- ① Redoxstate 立石電機製 レドキシメーター (右室前壁)
- ② 心筋組織酸素濃度 (酸素電極法) MT 技研 POG 200 (左室前壁又は中隔)
- ③ 心筋組織血流量 (交叉熱電対法) MT 技研 M-コーダー (左室前壁)
- ④ 高エネルギーリン酸化合物 (ATP ADP AMP CP) > 毎 30~60分
- ⑤ ミトコンドリア活性

と安全性を検討した。同時にポーラログラフィによる心筋内酸素濃度、交叉熱電対法による心筋局所血流量を測定した。さらに、in vitro で高エネルギー磷酸化合物、ミトコンドリア呼吸能を測定し、microfluorometry、心筋内酸素濃度から得られた情報と比較検討し、虚血による心筋細胞、心筋ミトコンドリアの破壊に関して若干の知見を得たので報告する。

方 法

体重 10~16 kg の雑種成犬 20 頭を用い、0.4 ml/kg のソムノベンチルにて静脈麻酔を行ない、気管内挿管後、Harvard 型レスピレーターに接続し room air により間歇的陽圧呼吸を行なった。第 4 肋間にて胸骨横断による両側開胸を行ない、送血管は右総頸動脈に、脱血管は右心耳より右房に挿入し、体外循環下に実験を行った。人工心肺装置は、ローラー型ポンプと Temptrol Q 110 または、JMS LA1-100 人工肺を使用、充填液として、乳酸リンゲル液、7%重炭酸ソーダ液、カルシウムグルコネート、および20%マニトールを加えたものを使用し、灌流量は 80 ml/kg とした。心筋温測定は、テルモ社製温度計を使用し、針型プローブを左室壁に穿刺固定した。体外循環が安定したところで、上行大動脈を遮断し、大動脈基部に穿刺した 14G、テフロン針より、手法で、心停止液（塩化カリウム 5 mEq + 生理食塩水 15 ml）を注入して心停止を行なった。（約 15 ml）。

同時に生理食塩水から作成した ice slush による局所冷却を加えて、心筋温を 15°C 前後に維持した。一方、体外循環中にリザーバーより得た血液に塩化カリウム (2 ml/100 ml) を加えて、K⁺ が約 25~30 mEq/l になるようにし、4°C 前後に冷却した灌流液 (Cold Blood Cardioplegia Solution CBC 液) を 30 分毎に、テフロン針より、1m の落差で 10 ml/kg の量を注入した。

細胞内 redox state の測定のため、立石ライフサイエンス研究所製 redoximeter のプローブを右室前壁にアロンアルファにめ貼付し、これを 3 mm 径、70 cm のガラスファイバーにて redoximeter 本体に接続した。ポーラログラフィによる心筋内酸素濃度の測定は、市販のエナメル線を電極として用い、これを左室心筋に穿刺し、MT 技研製 POG 200 に接続し、連続記録を行った。また、交叉熱電対法による心筋局所血流測定は、ニードルタイプのプローブを、左室前壁に穿刺固定し、MT 技研製 M コーダーに接続し連続記録を行なった。

一方、これらの測定実験とは別に、25頭の犬を使用した同じ実験条件下で、30~60分毎に、CBC 液の冠動脈注入直後（一部は、冠動脈注入前後）に左心室心尖部の心筋を切除し、その一部は、瞬時に液体窒素にて凍結した。これを凍結したまま粉碎して、その 1 g に PCA 液 (6% Perchloric acid + 0.5 × 10⁻³ モル EDTA) を加え、10,000 rpm で 15 分間遠沈し、その上清液を 69

表 2

測定方法

ミトコンドリア活性

Isolation Medium

0.225 M Mannitol 0.075 M Sucrose 0.05 mM EDTA (PH 7.4)

Tris buffer 1 M

Crystalline bacterial proteinase 10 mg

Reaction Medium

0.3 M Mannitol 10 mM Tris 10 mM KCl 0.2 mM EDTA

10 mM Glutamate

10 mM Succinate

0.5 mM ADP

Estimation of Protein Lowry の方法による。

高エネルギーリン酸化合物

心筋切除後急速に液体窒素で、凍結したものを 6%過塩素酸で均質化、除蛋白を行ない、69% K₂CO₃ で PH5.5~6.0 とする。

① ATP, CP W. Lamprecht の方法

② ADP, AMP D. Jaworek の方法

$$\text{Energy Charge} = \frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

% K_2CO_3 にて pH 6 に滴定し、さらに 10,000 rpm で5分間遠沈した。この上清液をサンプルとして、Lamprecht^{23,24)} らの方法で、adenosinetriphosphate (ATP), creatine phosphate (CP) を、Jaworek¹⁹⁾ らの方法で、adeninediphosphate (ADP), adeninemonophosphate (AMP) を定量し、

$$\text{Energy Charge} = \frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

の式から、Energy Charge¹⁾ を計算した。

また切除した心筋の残りは、Chance と Hagihara の方法を改良した Tyler³⁶⁾ の方法に準じて、心筋内ミトコンドリアを分離した。

また分離したミトコンドリアの蛋白量は、Lowry の方法²⁵⁾ により定量した。分離したミトコンドリアは Chance^{6,7,17)} の方法により、ポーラログラフィにより Respiratory Control Index (RCI), ATP/O, ST₃ を計算した^{30,34)}。

結 果

microfluorometry 法による蛍光量の変化は、遮光した状態を 0%, 非虚血心筋における生理的状态での蛍光量を 100% とすると、大動脈遮断、心停止液注入により蛍光量は増加し、約 2 分で 180% に達しプラトーとなった。

遮断 30 分後、60 分後の K^+ の冷加却血液 (10 ml/kg) の注入により、蛍光量は 1 分以内に減少し 100% の基線に戻った (心筋 Viability—Grade 1)。

CBC 液の注入終了後、再び蛍光量は増加し、180% でプラトーに達した。

遮断 90 分後の CBC 液注入では、蛍光量の減少は 100% に復するが、1 分以上を要するようになった (心筋 Viability—Grade 2)。また、注入終了後、再び蛍光量は増加するが、遮断直後、30 分後、60 分後の場合と異なって、平均して 175% 迄しか達しなかった。

遮断 120 分後の CBC 液注入では、蛍光量は 1 分以上かかって 100% の基線に復した (Grade 2)。注入終了後の蛍光量の増加は平均 170% にとどまった。

遮断 150 分後の CBC 液注入では、蛍光量の減少は 120 分後とほぼ同様な変化を示した (Grade 2)。注入終了後の蛍光量の変化はさらに小さく平均 160% にとどまった。

遮断 180 分後の CBC 液注入では、蛍光量の減少は小幅となり、ほとんど 100% の基線に戻らなくなった。注入終了後の蛍光量の増加の程度もさらに小さくなり、平均 150% であった (Grade 3)。

遮断 210 分以降、CBC 液注入時、終了の蛍光量の変化はしだいに縮少し、減衰して 120~130% で終結した (Grade 4) (図 1 上段、図 2 は模式化したもの)

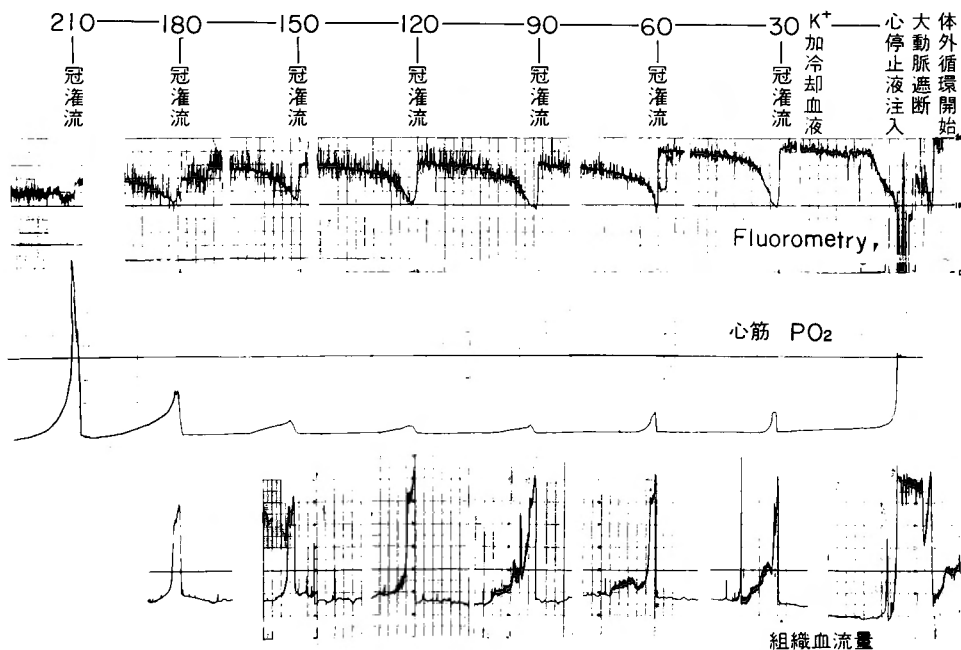


図 1

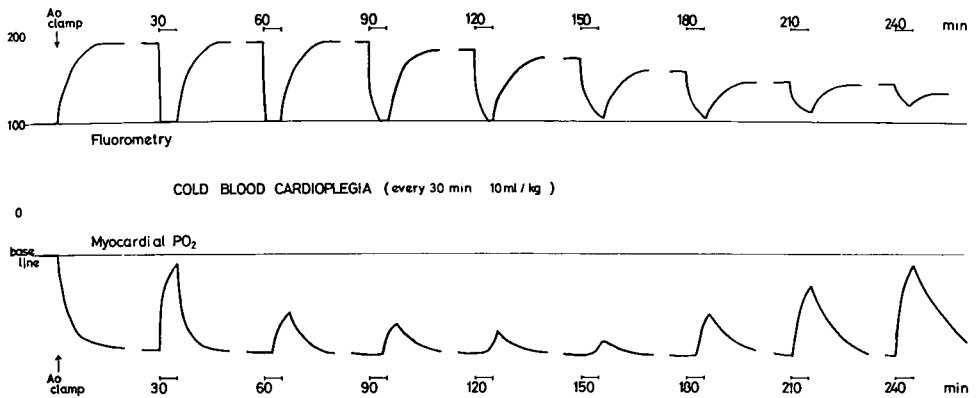


図 2

心筋内酸素濃度（心筋 PO_2 ）は大動脈遮断，心停止後減少し，約10分でプラトーに達した．遮断30分後のCBC液の注入により，心筋 PO_2 は増加するが，遮断前の基線に戻らないことが多かった．遮断60分後，90分後，120分後と，CBC液注入で増加するが，増加の程度は漸減した．また注入開始から心筋 PO_2 の上昇までの time delay がわづかづつ増加する傾向を見せた．遮断150分後のCBC液注入時の心筋 PO_2 の増加が最低となり，その後，遮断180分後，210分後と，同じ血液の流入量，流入速度でも，心筋 PO_2 の増加の程度は大きくなり，遮断前の基線に達する場合もあった．（図1中段，図2下段）

交叉熱電対法による心筋内局所血流量は，CBC液注入時，瞬時に増加を示す．しかも各注入時の増加の程度に差はなくほぼ，一定であった．（図1下段）

心筋組織 ATP は，大動脈遮断前が， $3.78 \pm 0.21 \mu \text{ moles/kg wet tissue}$ であり，遮断60分後 $2.55 \pm 0.30 \mu \text{ moles/g wet tissue}$ ，遮断90分後 $2.35 \pm 0.78 \mu \text{ moles/g wet tissue}$ ，遮断120分後， $2.16 \pm 0.35 \mu \text{ moles/g wet tissue}$ ，遮断150分後 $2.00 \pm 0.32 \mu \text{ moles/g wet tissue}$ と漸減し，遮断180分後は， $1.79 \pm 0.34 \mu \text{ mole/g wet tissue}$ であった．大動脈遮断前と，遮断60分後では， $p < 0.01$ で有意に減少し，さらに遮断180分後は，60分後と比べて， $p < 0.01$ で，有意に減少してい

表 3

	ATP	ADP	AMP'	Energy Charge	C. P
大動脈遮断前	3.78 ± 0.21	0.89 ± 0.15	0.13 ± 0.04	0.93 ± 0.02	2.81 ± 0.21
60分	2.55 ± 0.30	0.35 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.91 ± 0.01	前 0.24 ± 0.09 後 2.61 ± 0.41
90	2.35 ± 0.78	0.57 ± 0.11	0.17 ± 0.05	0.86 ± 0.02	前 0.38 ± 0.08 後 1.48 ± 0.09
120	2.16 ± 0.35	0.60 ± 0.17	0.14 ± 0.09	0.87 ± 0.04	前 0.60 ± 0.08 後 2.01 ± 0.54
150	2.00 ± 0.32	0.58 ± 0.16	0.10 ± 0.05	0.85 ± 0.04	前 0.62 ± 0.11 後 1.37 ± 0.55
180	1.79 ± 0.34	0.60 ± 0.16	0.15 ± 0.07	0.82 ± 0.04	前 0.63 ± 0.19 後 1.25 ± 0.71
実験数	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9

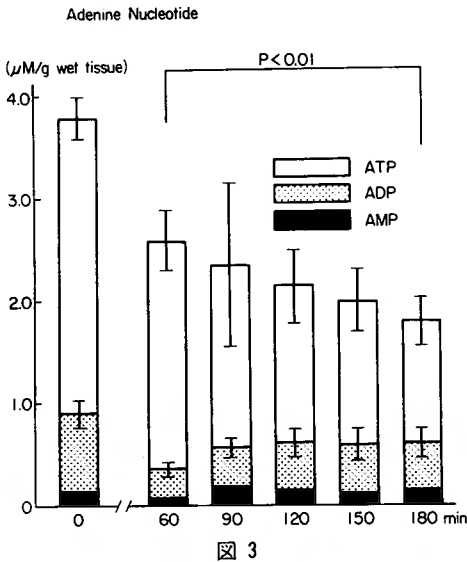


図 3

た。(表3)(図3)。心筋組織 ADP および、AMP は、表3、図3に示すように、特に一定の傾向は見られなかった。これら心筋組織内 ADP, ADP,AMP から Energy Charge を算定すると、(表3、図4)大動脈遮断前、 0.94 ± 0.01 、遮断60分後 0.86 ± 0.02 、90分後 0.86 ± 0.02 、遮断120分後 0.87 ± 0.04 、遮断150分後 0.85 ± 0.04 遮断180分後 0.83 ± 0.04 であり、180分後は、60分後と較べて $p < 0.01$ で有意に減少していた。

CP は、大動脈遮断前は、 $2.81 \pm 0.21 \mu\text{ moles g wet tissue}$ であったが、虚血により急激に減少し、遮断60分後の CBC 液注入直前には、 $0.24 \pm 0.09 \mu\text{ moles g wet tissue}$ であったが、CBC 液注入直後、 2.61 ± 0.41

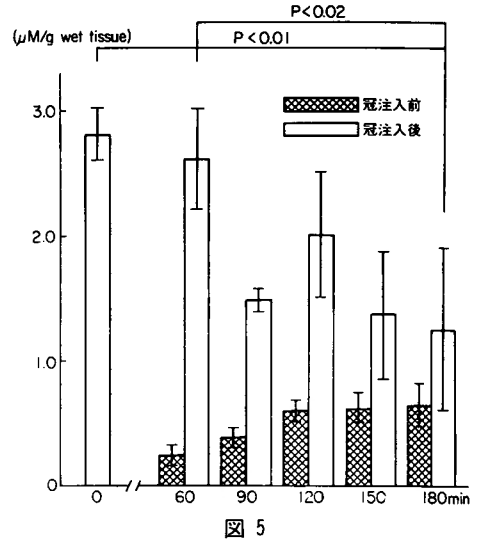


図 5

$\mu\text{ moles g wet tissue}$ と再び増加した。遮断後90分、120分、150分も同様な変化を示し、遮断180分後の CBC 液注入直前では、 $0.63 \pm 0.19 \mu\text{ moles g wet tissue}$ 、CBC 液注入直後は $1.25 \pm 0.71 \mu\text{ moles g wet tissue}$ であったが、60分後注入時と較べると、 $p < 0.02$ で有意に減少した。(表3、図5)

一方、ミトコンドリアの呼吸能は(図6)、glutamate を基質とした場合の、Respiratory Control Index (RCI)、ATP/O、 ST_3 は図7に示す如くであった。また succinate と glutamate を基質とした場合の RCI、ATP/O、 ST_3 は図8に示す如くであった。いずれの場合も $n=3$ で、実験数が少なくははっきりした傾向は得られなかったが、180分では呼吸能低下の傾向が見られた。

考 察

第一報⁸⁾では、大動脈遮断による虚血状態から、血液を再灌流した時点での螢光の減少の速度と量から、心筋の Viability を4段階に分類して報告した。しかしながら研究を重ねているうちに、大動脈遮断時、冠動脈灌流終了時の螢光増加の速度や量にも、虚血時間に伴って変化してくることが明らかとなった。

すなわち、Grade 1 では、螢光量は180%まで増加する。Grade 2 では、螢光量は160~170%の増加にとどまる。Grade 3 では、螢光量の増加はさらに小さくなって、150%前後で、Grade 4 では螢光量は、140%

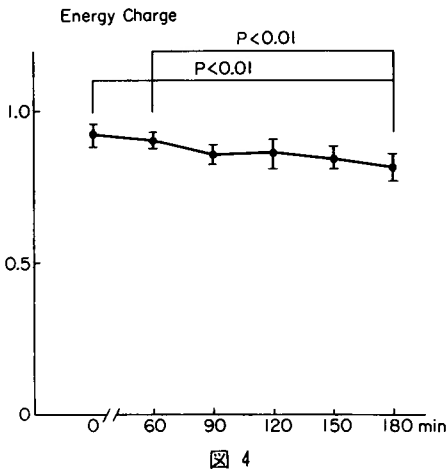


図 4

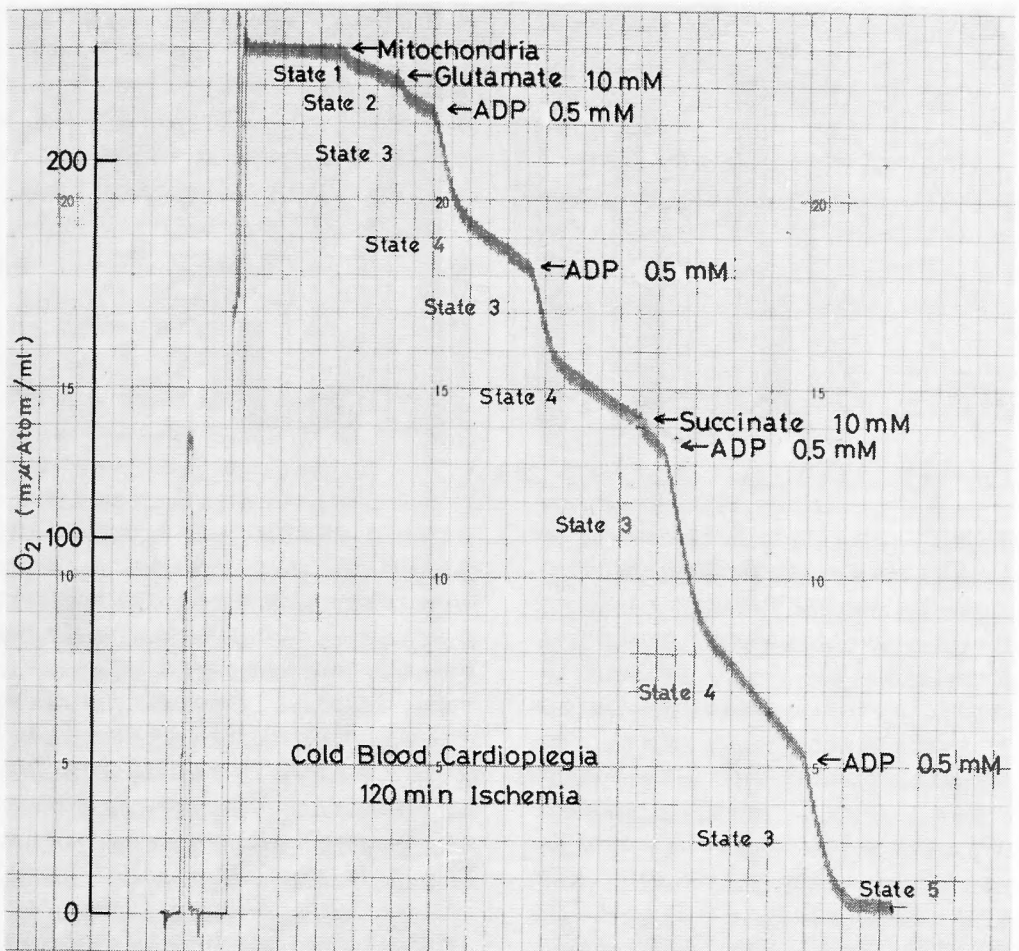


図 6

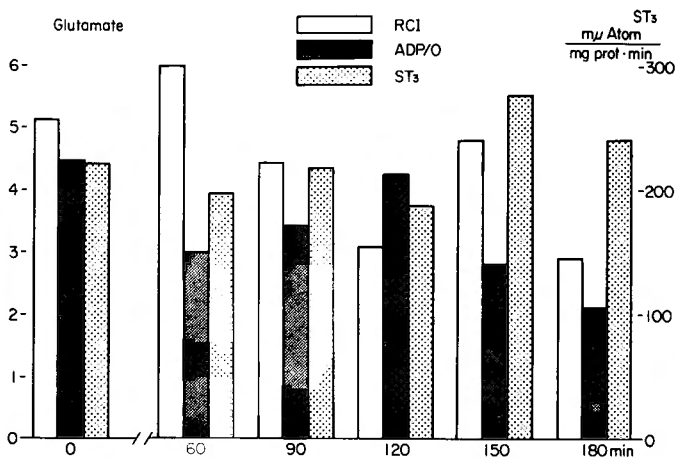


図 7

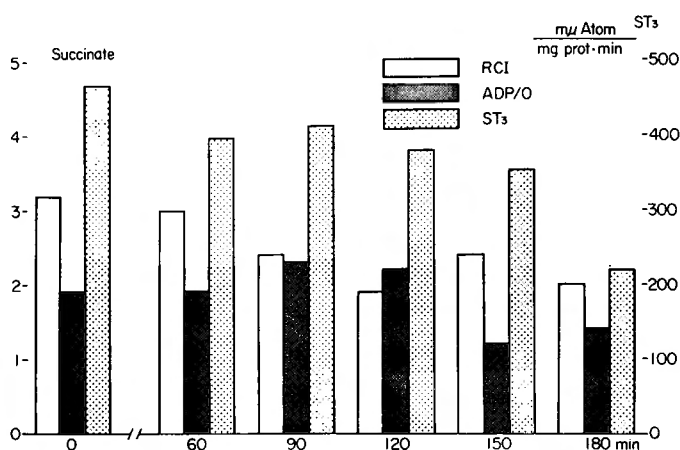


図 8

以下の増加にとどまる。また、螢光量増加の程度の減少とともに、虚血開始から、螢光量が最高値でプラトーに達する迄の時間が延長する傾向が見られた。

この螢光量の変化の推移の解釈は非常に難しいところである。

虚血中は、ミトコンドリア内の電子伝達系は低酸素状態のため進まない。このため、ミトコンドリア内の NAD はほとんど NADH となり、redox state は還元状態となる。ところが、細胞質内では、pyruvate は acetyl CoA から Krebs cycle へ進めない結果、lactate 形成へ進む。この時、同時に NADH が NAD に酸化されるため、酸素が存在しなくともしばらくは解糖系は進むわけである⁸⁾。K⁺ 加冷却血液注入により、酸素が供給される結果、ミトコンドリア内では、電子伝達系が進み、停滞していた NADH は酸化されて、redox state は、虚血前の状態に戻る。ところが、虚血時間が90分以後では、虚血による低酸素状態においても、螢光量は、90分以前と較べて、増加の程度が小さくなる。すなわち、ミトコンドリア内の NAD が、全て NADH に還元されないで残っているためか、または、pyridine nucleotide (NAD, NADH) の総和が、虚血により減少したためか、次第に NADH が減少することを示している。しかし虚血時間 180分までは、K⁺ 加冷却血液注入により NADH は酸化されて、もとの redox state に戻る。さらに虚血時間が180分以下になると、虚血による低酸素状態での NADH はさらに減少するとともに、K⁺ 加冷却血液注入により心筋に酸素が供給されても、もはや NADH は全て、NADH に酸化されない。

すなわち、虚血時間90分以後180分までは、NAD から NADH へ還元がおこなわれるミトコンドリア内の Krebs cycle や、脂肪酸の β 酸化過程に障害が最初に起って来る。そして180分以後には、電子伝達系に障害がおよんで、その後も虚血が続くならば、ミトコンドリアは完全に破壊される。それと同時に、細胞質も破壊され、細胞全体が還元状態で死滅するのであろうと推測した。このミトコンドリア内の電子伝達系の障害を裏付けるものとして、同時に測定した心筋 PO₂ がある。大動脈遮断後、最低の濃度でプラトーに達した心筋 PO₂ は、K⁺ 加冷却血液の注入により、上昇するが、その上昇の程度は、150~180分まで、漸減し、その後漸増するようになる。冷却血液注入による酸素の供給量は、交叉熱電対法による心筋組織局所血流量は、実験結果から明らかである如く、各注入時で、ほぼ同様であることから、ほぼ同じ量であると考えられる。また、心筋による酸素摂取率は、虚血時間の延長とともに組織間質の浮腫によりむしろ減少する。また、細胞内に摂取された酸素の90%以上はミトコンドリアで消費されることを考え合わせると²⁶⁾、虚血180分以後、ミトコンドリアでの酸素消費が減少しているものと考えられ、すなわち、ミトコンドリア内電子伝達系の障害の進行を示している。

以上のことから、間歇的 K⁺ 加冷却血液による心筋保護法は、著者の方法によると、180分が、ミトコンドリアの critical point となると考えられる。そこで、in vitro で、心筋組織内高エネルギー磷酸化合物、ミトコンドリア呼吸能を測定し比較してみた。その結果、高エネルギー磷酸化合物についてみると、ATP は虚

虫により減少し、遮断180分後では、60分後と較べて、 $p < 0.01$ で有意に減少している。これを Energy Charge で算定すると遮断180分後では、大動脈遮断前、遮断60分後と較べて、 $p < 0.01$ で、同じく減少している。さらに、CP は、虚血により急激な減少を示すが、 K^+ 加冷却血液の注入により再び貯えられる。しかし虚血時間の延長にともなって、次第に減少し、遮断180分後では、遮断前と較べて $p < 0.01$ 、遮断60分後と較べても、 $p < 0.02$ で有意に減少し、Fluorometry, 心筋 PO_2 から得られたデータと、同じような結果を示した。ところが、ミトコンドリア呼吸能については、glutamate を基質として測定する場合も、glutamate+succinate を基質として測する場合のいずれも、ややばらつきが多く、180分で、ミトコンドリア呼吸能が有意に減少するという結果は得られなかった。このことは、ミトコンドリア浮遊液による呼吸代謝の測定は、当然の事ながらミトコンドリアをとりまく環境がとり外されていること。生体を一度酸素状態にしてから分離したミトコンドリアに余分の酸素を与えて測定すると、正常のミトコンドリアの酸素利用能を上まわると²⁶⁾の報告もあり、in vitro のミトコンドリアから得られたデータと、in vivo のデータと比較することに無理があると考えられる。

ところで、組織酸素濃度の測定には酸素電極法がよく使用され、組織血流量の測定には、交叉熱電対法や水素ガスクリアランス法が用いられる。心筋組織酸素濃度と心筋組織血流量の測定は、各種吸入麻酔剤¹⁸⁾や、冠拡張剤や強心昇圧剤³⁵⁾などの心筋におよぼす影響、あるいは、冠動脈結紮後の冠循環の変動を調べる目的³⁷⁾で、動物実験に多く用いられて来た。酸素電極法に使用する電極には、従来白金電極が使用されてきたが、白金は高価な貴金属であり、そのポーラログラムに定常なプラトー形成が起りにくいこともあり、市販されている銅エナメル線の断端がそのまま再現性のよい酸素電極となり得ることを八木らは報告している⁴¹⁾。酸素電極法の問題点として、再現性と安定性があり、長時間測定すると、電極の表面に次第に種々の塩類が析出し感受性が低下する aging 現象が生ずる。このため、電極の表面をセロファン膜やポリエチレン膜で被覆する方法なども試みられているが、即応性に欠け、生体内での急性変化を連続的に捉えにくい欠点がある。また酸素電極法では、組織の酸素分圧は絶対値として算出することはむづかしいといわれ、著者の実験でも相対的な変化として表わしている。

虚血による低酸素状態では、好氣的代謝が抑制されるため、高エネルギー磷酸化合物 (ATP) の産生が低下する^{3,4,10)}。このため細胞内の ATP 含量が次第に減少しはじめる²⁰⁾。

ATP が、 $2.5 \mu \text{ mole/g wet tissue}^{36)}$ あるいは、 $2 \mu \text{ mole/g wet tissue}^{5)}$ になると、もはや再灌流を行っても心筋の収縮がおこらない不可逆性の変化を来すと報告されている。それゆえ、開心術において、虚血による心停止中の心筋保護の目的は、大動脈遮断後できるだけすみやかに拡張期心停止を得て、ATP の消費を最小限におさえること。局所冷却を加えて^{2,16,32)}、心筋温を 10°C 前後に維持することで、代謝を抑制し ATP の消費をおさえることである。

現在心筋保護液として、カリウム、マグネシウムや、膜安定剤としてのプロカインを含んだ晶質液、GIK 液²²⁾、Kirsh 液²¹⁾、Bredschneider 液³¹⁾をはじめ、それらを改良した種々の電解質液^{11,13,27,28)} が使用され、最近では、ステロイド^{9,29)}、カルシウム拮抗剤²⁸⁾、コエンザイム Q_{10} なども使用されるようになった。1979年、Follete¹⁴⁾ らが報告した間歇的 K^+ 加冷却血液法 (intermittent cold blood cardioplegia) は、低温による心筋代謝の抑制、完全な心停止状態による高エネルギー磷酸化合物の保存に加えて、酸素供給により細胞内好気性代謝の促進をはかり、エネルギー産生を目的としたものである¹²⁾。cold blood cardioplegia において、この目的が十分に達成されることは、今回の実験で明らかである。すなわち、redoximeter で、螢光量の減少、心筋内酸素濃度の上昇、そして CP の急激な上昇、この creatine phosphate は、ADP に高エネルギー磷酸結合を与えて ATP が再合成され、ATP を十分に維持するための高エネルギー物質として存在する^{39,40)}。

これらの実験を通して、intermittent cold blood cardioplegia 法により心筋保護法は、細胞レベル、分子レベルから見た場合、大動脈遮断180分までは、安全であろうと考えられる。それより越えると、ミトコンドリア内の代謝系の破壊が進行し、もはや不可逆性変化を来すものと考えられる。

結 論

心筋保護法の1つである、intermittent cold blood cardioplegia 法について、microfluorometry による心筋ミトコンドリア内 redox state、ポーラログラフィによる心筋組織酸素濃度、交叉熱電対法による心筋局所

血流量, ミトコンドリア呼吸能, および高エネルギー磷酸化合物 (ATP, ADP, AMP, CP) を測定し, 細胞レベル, 分子レベルから, その効果と安全性を調べた. 同時に, 虚血による心筋ミトコンドリア, 細胞破壊に関して若干の知見を得た.

その結果は, 大動脈遮断60分迄は, 心筋 Viability は良好で, その後180分迄, 少しずつミトコンドリア内, Krebs サイクル, 脂肪酸 β 酸化過程に障害があらわれ, 遮断180分以後, ミトコンドリア内電子伝達系に破壊がおよぶ. その結果, ミトコンドリアで酸素が充分に利用できなくなり, 心筋組織酸素濃度は上昇しはじめる.

高エネルギー磷酸化合物の ATP, CP は虚血により減少し, 大動脈遮断180分では, 有意に減少する. しかし, ミトコンドリア浮遊液によるミトコンドリア呼吸能は, ばらつきが多く, 大動脈遮断180分でも, 有意な減少は示さなかった.

本論文の要旨は, 第33回 日本胸部外科学会総会 (東京, 1980) および, 第45回日本循環器学会総会, 夜の談話会—心筋保護— (東京, 1981) において発表した.

稿を終るにあたり, 終始御指導を頂き, 且つ御校閲を賜りました恩師日笠頼則教授, 並びに御指導, 御教示頂きました竜田憲和講師に深く感謝の念を表します. また研究を手伝って頂きました白石義定先生, 御指導頂きました本外科学教室第一講座小沢和恵先生はじめ5研の皆様に厚く御礼申し上げます.

参 考 文 献

- 1) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter interaction with feedback modifiers. *Biochem* **7**: 4030-4034, 1968
- 2) Barner HB, Standeven JW, et al: Topical cardiac hypothermia for myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **73**: 856-867, 1977
- 3) Berne RM: Adenine nucleotide metabolism in the heart. *Circ Res* **34** (Suppl 3): III-109-120, 1977
- 4) Berne RM, Rudolph R, et al: Adenosine and adenine nucleotides as possible mediators of cardiac and skeletal muscle blood flow regulation. *Circ Res* **28** (Suppl 1): I-115-119, 1971
- 5) Bretschneider HJ, Hübner G, et al: Myocardial resistance and tolerance to ischemia physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg* **16**: 241-246, 1958
- 6) Chance B, Williams GR: Respiratory enzyme in oxidative phosphorylation III. the steady state. *J Biol Chem* **217**: 409-427, 1955
- 7) Chance B, Williams GR: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* **17**: 65-134, 1956
- 8) 千葉幸夫: 心臓外科領域における microfluorometry の応用. 1, microfluorometry による心筋の Viability の判定. *日外宝* **51**: 307-314, 1982.
- 9) Codd JE, Wiens RD, et al: Steroids and myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **74**: 418-422, 1977
- 10) Danforth WH, Naegle S, et al: Effect of ischemia and reoxygenation on glycolytic reaction and adenosinetriphosphate in heart muscle. *Circ Res* **8**: 965-971, 1960
- 11) Engedal H, Skagseth E, et al: Effects of procaine-induced cardioplegia on myocardial ischemia, myocardial edema, and postarrest ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* **75**: 886-891, 1978
- 12) Engelman RM, Rouson JH, et al: The superiority of blood cardioplegia in myocardial preservation. *Circulation* **62** (Suppl 1): I-62-66, 1979
- 13) Follette D, Mulder D, et al: Prolonged safe aortic clamping by combining membrane stabilization, multidose cardioplegia, and appropriate pH reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* **74**: 682-694, 1977
- 14) Follette DM, Mulder DG, et al: Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia. experimental and clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* **76**: 604-619, 1978
- 15) Follette DM, Stead DL, et al: Advantages of intermittent blood cardioplegia over intermittent ischemia during prolonged hypothermic aortic clamping. *Circulation* **58** (Suppl 1): I-200-209, 1978
- 16) Griep RB, Stinson EB, et al: Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **66**: 731-742, 1973
- 17) Hagihara B: Technique for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Acta* **46**: 134-142, 1961
- 18) 飯島一彦: 各種吸入麻酔剤の心筋組織 PO_2 と心筋組織血流に及ぼす影響——交叉熱電対法, 酸素電極法——, 麻酔 **XX**: 610-626, 1971
- 19) Jaworek D, Gruber W, et al: Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate. In *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press 1957, p 2127-2131
- 20) Jones CE, Thomas JX, et al: Acute changes

- in high energy phosphates nucleotide derivatives and contractile force in ischemic and nonischemic canine myocardium following coronary occlusion. *Cardiovasc Res* **10**: 275-282, 1976
- 21) Kirsh U, Rodewald G, et al: Induced ischemic arrest. clinical experience with cardioplegia in open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **63**: 121-126, 1972
- 22) 北村信夫: 各種心筋保護法の実験的検討と GIK 液による冠灌流冷却法の臨床応用, *胸部外科* **31**: 507-512, 1978
- 23) Lamprecht W, Transchold I; Adenosine-5'-triphosphate Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press 1957, p 2097-2110
- 24) Lamprecht W, Stein P, et al: Creatine Phosphate. In *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press 1957, p 1776-1785
- 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 26) Mela LM: 健康な人とショック患者の酸素の役割, *The Organ in Shock*, 東京, 日本アブジョン株式会社 1980,
- 27) 村田雄彦: 各種心筋保護法の実験的, 臨床的検討, 特に Mannitol-Iusulin-Potassium (MIK)-Solution による間歇的冷却冠灌流法の臨床応用について, *日本外科宝函* **50**: 669-688, 1981
- 28) Nayley WG, Fassold E, et al: Pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle: effect of verapamil, propranolol and methylprednisolone. *Cardiovasc Res* **12**: 152-161, 1978
- 29) Nayler WG, Yopez C, et al: Protective effect of methylprednisolone sodium succinate on the ultrastructure and resting tension of hypoxic heart muscle. *Cardiovasc Res* **12**: 91-98, 1978
- 30) Ozawa K, Seta K, et al: The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. *J Biochemistry* **61**: 512-514, 1967
- 31) Reidemeister JC, Heberer G, et al: Induced cardiac arrest by sodium and calcium depletion and the application of procaine. *Int Surg* **47**: 535-542, 1967
- 32) Rosenfeldt FL, Watson A: I. Development of an invitro model of myocardial cooling. A study of the effect of cardiac size on cooling rate. *Ann Thorac Surg* **27**: 7-12, 1979
- 33) Shumway NE. Lower RR: Topical cardiac hypothermia for extended periods of anoxic arrest. *Surg Forum* **10**: 563-566, 1959
- 34) Sordahl LA, Johnson C, et al: The Mitochondrion. In *Methods in Pharmacology* vol 1. edited by Schwarz A, New York, Appleton-Century Crofts 1971, p 247-286
- 35) 高橋 功: 交叉熱電対法による肝循環動態の薬理学的研究, *日薬理誌* **60**: 308-325, 1964
- 36) Tyler DD, Gonze J. The preparation of heart mitochondria from laboratory animals. In *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press 1957, p 75-77
- 37) 内田康美, 上田英雄: α および β 受動体刺激薬の心筋局所血流におよぼす作用, *最新学医* **26**: 1382-1393, 1971
- 38) 渡部高久, 村重汎保, 他: 開心術時の心筋保護の研究 (特に心筋エネルギー代謝からみた評価), *日胸外会誌* **25**: 1107-1118, 1977
- 39) Wollenberger A, Krause EG: Metabolic control characteristic of the acutely ischemic myocardium. *Am J Cardiol* **22**: 349-359, 1968
- 40) Wright RN, Levitsky S, et al: Beneficial effects of potassium cardioplegia during intermittent aortic cross-clamping and reperfusion. *J Surg Res* **22**: 201-209, 1978
- 41) 八木舎四, 小島一夫, 他: 酸素電極としての銅エナメル線電極, *岩手医学誌* **15**: 193-202, 1963